

低栄養細菌を用いたテトラクロロエチレンの微生物分解

庄司 成敬, 大垣 眞一郎*
(水質環境部, *東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻)

Original

Degradation of tetrachloroethylene by oligotrophic bacteria

Shigenori SHOJI, Shinichiro OHGAKI*
(Water Quality Division, *Dept. of Urban Eng., Univ. of Tokyo)

Summary

Oligotrophic bacteria need little nutrition. These bacteria have the advantage of economy over copiotrophic bacteria for the purification of contaminated soil and groundwater. Oligotrophic bacteria, which did in the decomposition of PCE were screened in soil contaminated with PCE, and these bacteria are examined in its ability to utilize H₂ as an electron donor.

The results are as follows:

PCE was reductively dechlorinated to trichloroethylene and cis-1,2-dichloroethylene by the PCE-degrading mixed culture. Two oligotrophic bacteria were found in the PCE-degrading mixed culture. One had H₂ utilizing ability, and the other did not. It was presumed that trace metal concentration was important in screening oligotrophic bacteria in media, and that soil structure and soil surface are influences of PCE-degrading mixed culture on existence and growth.

Key words: oligotrophic bacteria, dechlorination, PCE, hydrogen, bioremediation

1. はじめに

半導体の洗浄や金属の脱脂等に用いられる有機塩素系溶剤による土壌・地下水汚染が顕在化してから 20 年近い歳月が過ぎ去ろうとしている。当初は、浄化対策も曝気による地下水から大気への汚染物質の放散や汚染土壌の風乾といった手法が取られていた。後に、真空抽出法や揚水曝気法により土壌・地下水から分離した汚染物質の活性炭による吸着除去、熱分解や光分解といった汚染物質の無害化技術が開発され、汚染土壌・地下水の浄化に使われてきている。一方、微生物を用いて汚染された環境を修復するバイオレメディエーションも新しく開発された方法の一つであり、この方法は原位置処理が可能であり、経済性に優れていると考えられ、将来的に期待されている浄化方法である。

揮発性有機塩素化合物の代表的な汚染物質であるトリクロロエチレン (TCE) は、嫌気条件下で塩素が水素に置換される還元的脱塩素化により、ジクロロエチレン類、塩化ビニル、エチレンへと微生物分解されることが知られている。また、好気条件

下ではメタンモノオキシゲナーゼやトルエンモノオキシゲナーゼ等の酸素添加酵素 (オキシゲナーゼ) によりコマタポリズム (共代謝反応) で分解される。

しかし、同じく汚染物質の代表であるテトラクロロエチレン (PCE) は、図 1¹⁾に示すような嫌気条件下での還元的脱塩素化のみが分解経路だと考えられている。還元的脱塩素化には電子供与体となる有機物や水素が必要なことが Freedman ら²⁾により、またその際に用いられる電子は有機物の酸化により供給され、直接の電子供与体としては水素が使われる事が Gibson ら³⁾により明らかにされている。また、DiStefano ら⁴⁾は、電子供与体としてメタノールまたは水素を添加し、実際に脱塩素反応を行う菌を水素利用菌と推定しており、Xavier ら⁵⁾は H₂ と PCE を電子供与体及び受容体として利用して PCE をエチレンへ脱塩素化する細菌を単離したことを報告している。

PCE により汚染された土壌・地下水の現位置処理を行う場合、土着の分解微生物を利用する方法と外部から分解微生物を添加する方法の 2 通り

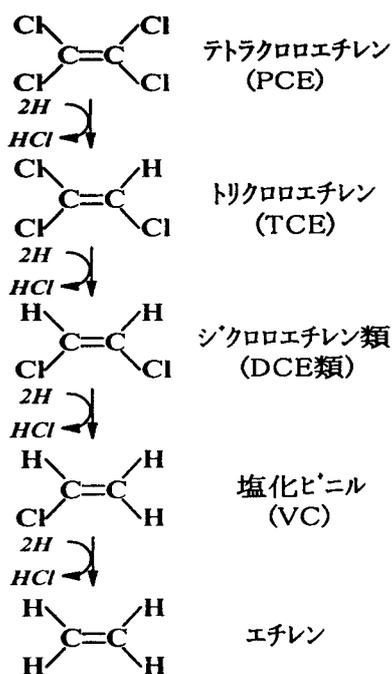


図1 テトラクロロエチレンの分解経路

が考えられるが、いずれにしても微生物の増殖と汚染物質の分解を行わせるために栄養源や電子供与体として有機物や無機塩類等を加える必要がある。この場合、分解に関与していない微生物にも栄養源は消費されてしまうため、栄養源は分解に必要な量より多めに添加せざるをえず、過剰に添加した栄養源や栄養源により増殖した病原微生物による地下水汚染が引き起こされる可能性がある。

ところで、土壌中には高濃度の有機物や無機塩類があると増殖が制限され、低栄養条件でしか増殖できない低栄養細菌が存在することが知られている⁹⁾。実際の汚染土壌中では人為的に外部から栄養源を添加していないにも係わらず分解が起きていることから、分解に低栄養細菌が関与していることが予想される。低栄養細菌を PCE の分解に利用し、更に水素を直接の電子供与体として使用できれば、栄養源の添加量を抑えつつ汚染を浄化することが可能と考えられる。

そこで、本研究では PCE による汚染が明らかであり、分解生成物である TCE や cis-DCE が確認されている汚染土を分離源として低栄養条件で PCE を分解する微生物を検索し、水素の添加により分解の促進が可能であるか検討した。

2. 実験方法

2.1 試薬

培地試薬には、和光純薬、関東化学製の試薬特級を用いた。メタノールは和光純薬製トリハロメタン測定用を、PCE は国産化学株式会社製を用いた。

また、PCE についてはろ過滅菌したものを滅菌蒸留水に添加して PCE 飽和水溶液を作成し、実験に用いた。検量線の作成及び分解生成物の同定には、SUPELCO 製 EPA 524.2 VOCMix と関東化学製揮発性有機化合物標準原液 I を用いた。ICP-MS に用いた試料の酸分解には和光純薬製の有害金属測定用の硝酸を用いた。

2.2 供試試料作成方法

試料としては、主に PCE により汚染されている3地点の土を用いた。表1に供試土壌のデータを示すが、3地点とも PCE の還元的脱塩素化により生じたと考えられる TCE や cis-1,2-ジクロロエチレンといった分解生成物が溶出試験により確認されている。試料Aは土壌の表層部分から採取した。また、試料B1及びB2は同一敷地内の異なる2地点に掘られた十数メートルの長さのボーリング試料から、それぞれ最も分解生成物の濃度が高い部分の土を選んだ。

表1 供試土壌

	土A	土B1	土B2
採取深度	表層	7m	19m
汚染物質	PCE TCE	PCE cis-1,2-DCE	DCM PCE TCE MC
土質	表土	ローム	ローム
色調	黒色	茶褐色	茶褐色

今回用いた試料は、全て不帯水層から採取しているため、微生物は土粒子に付着していると考えられる。この土を直接バイアル瓶に封入して培養を行う場合、PCE の土壌への吸着についても考慮する必要が生じる。そこで、滅菌水中に土を加えて攪拌及び超音波処理を行い、微生物を土粒子から滅菌水中に移動させ、滅菌水中に微生物を分散させた水を検体として用いることとした。

上記の3地点の汚染土を湿潤重量で各々 20 g 取り、予め蒸留水 200 ml と攪拌子を入れて滅菌しておいたねじ付き3角フラスコに加えて密栓した。汚染土を加えたねじ付き3角フラスコは、試験に必要な試料量を確保できる数を適宜作成した。用意した3角フラスコを10分間緩やかに攪拌し、5分間超音波処理を行った後、暫く静置させ土を沈殿させて上澄水を得た。上澄水を採取する際、採取地点の同じ汚染土の入った3角フラスコの上澄水は全て混ぜ合わせ、これを供試試料とした。図2に供試試料の作成手順を示す。

℃下暗所で倒立させて静置培養を行い PCE の分解について検討した。

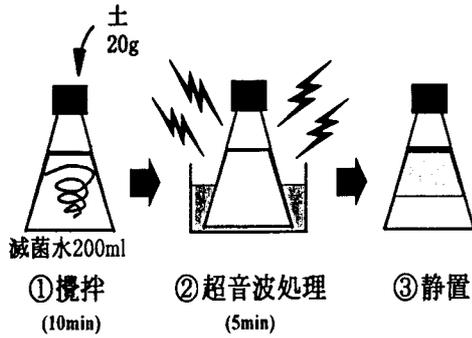


図2 検体作成方法

2. 3 PCE分解に及ぼす水素添加の影響

試料として用いた土壤中に、直接水素を電子供与体として利用し PCE を分解出来る微生物が存在すれば、水素ガスを添加することにより PCE の分解が進行するはずである。そこで、試料に無機栄養源と水素を添加する無機栄養源・水素添加系、水素を添加しない無機栄養源・水素無添加系を作成し、PCE の分解が進行するか検討した。また、試料として用いた土壤では PCE の分解が起きていることから、土中に含まれている栄養源だけでも分解は可能と思われるため、無機栄養源の代わりに蒸留水を用い、水素を添加する蒸留水・水素添加系についても検討した。検体の作成方法は以下の通りに行った。2.2 の方法で作成した試料を 49 ml 採り、68 ml 容のバイアル瓶に加え、無機栄養源添加系では予め滅菌しておいた表 2 に組成を示す無機培地 1 ml、蒸留水添加系では滅菌蒸留水 1 ml を添加し 50 ml とした。バイアル瓶の気相部をろ過滅菌した窒素ガスで置換し、滅菌済みのテフロンブチルゴムセプタムとアルミシールで密閉した。水素添加系ではセプタムを通して水素の体積が気相の 20% を占めるように気相の窒素ガスをろ過滅菌した水素ガスで置換した。

表2 培地組成

KH_2PO_4	$500\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	*微量金属溶液	
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	$920\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$200\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	$10\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	$\text{MnSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$20\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
NaCl	$300\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	CuSO_4	$40\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$300\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$20\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
微量金属溶液*	10ml	H_3BO_3	$3\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
		CoCl_2	$4\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
		$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$4\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

PCE の飽和水溶液を全量液相に溶けた場合 $0.1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ となるようにセプタムを通して添加し、30

2. 4 PCE分解に及ぼす温度条件

実際に現位置処理を行う場合、土壤・地下水は 2.3 の実験における培養温度 $30\text{ }^\circ\text{C}$ より低温な条件下にある。神奈川県内においては平成9年度の地下水温は $13.2\sim 26.7\text{ }^\circ\text{C}$ の範囲であり⁷⁾、こういった温度条件下でも微生物が増殖し、分解が進まなければ処理には適用できない。そこで、2.3 と同じ要領で作成した無機培地・水素添加系の検体を $15\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 下で培養し、各々の温度における PCE 分解について検討した。

2. 5 PCE分解菌の集積培養

PCE の分解が見られた検体から優先的に PCE 分解菌を増殖させるため、表 2 に示した培地を蒸留水で 1/50 の濃度に希釈し、炭素源として上澄水と同じ TOC 濃度となるように酢酸 Na を加えた培地（以下、低栄養培地）を作成し、集積培養を行った。

検体の作成は、以下の通り行った。上述した低栄養培地 49 ml を入れて予め滅菌しておいたバイアル瓶に、2.3 で PCE の分解がみられた試料を遠心分離処理 ($1,000\text{rpm}$ 、6分間) して得た上澄み液 1 ml を加えた。次に、バイアル瓶の気相部をろ過滅菌した窒素ガスで置換し、予め滅菌しておいたテフロンブチルゴムセプタムとアルミシールで密閉した。セプタムを通して水素の体積が気相の 20% を占めるように気相の窒素ガスをろ過滅菌した水素ガスで置換した。PCE の飽和水溶液を全量液相に溶けた場合 $0.1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ となるようセプタムを通して添加し、 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 下暗所で倒立させて静置培養を行った。

2. 6 改良低栄養培地によるPCE分解菌の集積培養

実際の汚染土壤に分解微生物を添加してバイオレメディエーションを行わせようとする場合、汚染現場にいる分解微生物の増殖・活性が可能な場合は、添加した微生物による顕著な浄化効果は見られないという見解が一般的である⁸⁾。この理由の一つとして、実験条件と汚染現場における栄養源の組成や濃度の違いが分解能力の発現や微生物の増殖を阻害していることが考えられる。もし、栄養源の組成や濃度の違いが分解能力の発現や増殖を阻害しているならば、実際に環境中において分解微生物を検索する段階から、分解や増殖に必要な物質とその濃度を把握しておく必要があると思われる。また、集積培養や分解菌の単離操

作を行う上でも、培地の組成と濃度は重要な因子となる。そこで、2.5 で検討した結果を基にして作成した改良低栄養培地を用いて PCE 分解菌の集積培養を試みた。なお、検体の作成は、培地として表 3 に示す改良低栄養培地を用い、その他は 2.5 に準じて行った。

表 3 改良低栄養培地組成

酢酸ナトリウム	92.0mg·l ⁻¹	*微量金属溶液	
KH ₂ PO ₄	10.0mg·l ⁻¹	MnSO ₄ ·5H ₂ O	20mg·l ⁻¹
(NH ₄) ₂ HPO ₄	18.4mg·l ⁻¹	CuSO ₄ ·5H ₂ O	60mg·l ⁻¹
CaSO ₄ ·2H ₂ O	80.0mg·l ⁻¹	CoCl ₂	4mg·l ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	60.0mg·l ⁻¹	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	4mg·l ⁻¹
Na ₂ SO ₄	20.0mg·l ⁻¹		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.4mg·l ⁻¹		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.2mg·l ⁻¹		
H ₃ BO ₃	0.2mg·l ⁻¹		
微量金属溶液*	0.2ml		

2.7 分析方法

添加した PCE と分解生成物である TCE 等の塩化エチレン類については、バイアル瓶の気相をヘッドスペース法により電子捕獲型検出器付き島津製ガスクロマトグラフ (GC) または HP 製ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を用いて分析した。pH、COD、全窒素、全リンについては JIS K0102 に従い分析を行った。全有機炭素 (TOC) については島津製 TOC5000 により燃焼-赤外線分析法で測定した。また、上澄水や低栄養培地及び地下水中の元素については横河アナリティカルシステムズ社製 ICP 質量分析装置 (ICP-MS) HP4500 により半定量分析を行った。表 4 に GC、GC/MS、ICP-MS の分析条件を示した。

表 4 分析条件

GC:島津製GC9A Column:AQUATIC(GLSciences) (60m×0.25mm;I.D. 1.0μm) OVEN.Temp 100°C INLET.Temp 200°C DETECTOR.Temp 200°C Gas Flow Rate: 1ml/min N ₂ Make-up gas N ₂ at 20ml/min	GC:HP製GC5890Series II MS:HP製5989A MASS SPECTROMETER Column:AQUATIC (GL Sciences) (60m×0.25mm;I.D. 1.0μm) OVEN.Temp 40°C(5min)→Rate:10°C/min→200°C(1min) INLET.Temp 200°C DETECTOR.Temp 200°C Gas Flow Rate: 1ml/min He MASS Spec Temp Source 200°C Quad 100°C Electron Energy:70.0eV
ICP-MS ICP-MS:横河アナリティカルシステムズ製HP4500 RF Power:1.5kw Plasma gas flow:1.5 l/min Carrier gas flow:1.5 l/min Sample uptake rate:0.35ml/min	

3. 結果及び考察

3.1 PCE分解に及ぼす水素添加の影響

水素添加による PCE の分解について、3 種類の試料を用いて検討した結果を表 5 に示した。試

料 A で無機栄養源・水素添加系及び蒸留水・水素添加系において PCE の分解が進み、TCE を経て cis-1,2-ジクロロエチレンが確認された。試料 A の PCE 分解結果について図 3 に示した。また、試料 B 1 及び B 2 については、水素添加・無添加に係わらず無機培地添加・蒸留水の両方で PCE は分解されなかった。試料 A の洗浄上澄水の TOC、窒素及びリン濃度は、表 6 に示したように、各々 23、1.8、0.03 mg·l⁻¹ であり、栄養源がこの程度存在すれば、試料 A 中には水素を電子供与体

表 5 供試土壤による PCE 分解結果

	土A	土B1	土B2
無機栄養源 ・水素添加系	++	-	-
無機栄養源 ・水素無添加系	+	-	-
蒸留水 ・水素添加系	++	-	-

++:分解率50%以上 +:分解率50%以下 -:分解無

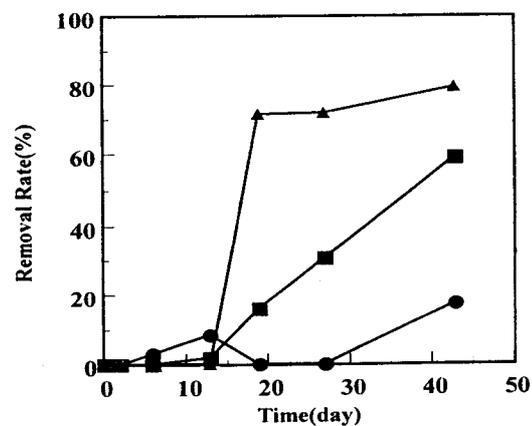


図 3 汚染土 A の洗浄上澄水による PCE の分解

表 6 各培地の測定値

	洗浄上澄水	低栄養培地	改良低栄養培地
pH	6.5	7.0	6.9
COD	33	3.4	4.5
TOC	23	27	25
T-N	1.8	3.6	3.3
T-P	0.03	6.4	6.1

単位:mg·l⁻¹
pHを除く

として PCE を分解できる菌が存在すると考えられた。なお、対照となる水素無添加系においても極微量の TCE が検出されたが、それ以上 PCE の分解は進まなかった。

試料 A において、蒸留水・水素添加系の方が無機栄養源・水素添加系より分解速度が速い結果が得られたが、この理由としては「3.3 PCE 分解菌の集積培養」で詳述するが、無機培地を添加したことにより検体中における金属元素類の濃度が、添加前の検体中における金属元素類の濃度とかなり異なったことが原因ではないかと考えられた。つまり添加した無機栄養源により幾つかの金属元素の濃度が変化したため、PCE 分解が阻害されたか、PCE 分解に関与しない微生物の増殖を引き起こし、分解菌の増殖や PCE の分解が抑制されたのではないかと考えられた。

試料 A とは異なり、試料 B 1 及び B 2 からは PCE 分解菌が得られなかった。この理由としては、上述したように、添加した無機栄養源による検体中の金属元素類の組成・濃度変化による影響や、B 1 及び B 2 の土に生息していた PCE 分解菌は、酸素が有害物質として作用する偏性(絶対)嫌気性菌であり、検体作成時に酸素と接触して死滅した可能性が考えられた。

3. 2 PCE 分解に及ぼす温度条件

PCE 分解が生じる試料 A から 2.2 の方法で作成した検体を、30℃、25℃、15℃の条件下で培養し、PCE 分解に及ぼす温度への影響を調べた。生化学反応は一般にフント・ホッフ(van't Hoff)の法則に従い、ある限定された温度範囲内では、10℃の温度増加に対し、反応速度が2倍になる。ゆえに温度の高い30℃の方が分解が速いと予測されたが、図4に示すように25℃の方が分解が速かった。30℃より25℃の方が分解が速かった理

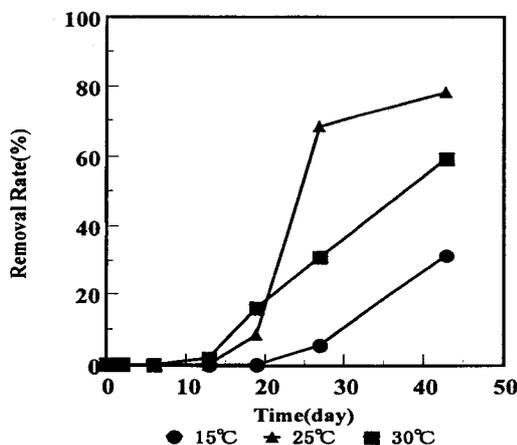


図4 汚染土の洗浄上澄水によるPCE分解に及ぼす温度の影響

由は、温度増加に対しては水への水素の溶解度が逆に減少するため、つまり微生物への水素の供給量が30℃では25℃よりも不足したためと推測された。

現位置処理を行う際、現場の地温や水温で分解可能な必要があるが、15℃でも分解は進むことから、温度の面では現位置処理の上で特に問題は無いと考えられた。

3. 3 PCE分解菌の集積培養

表2に示した培地を蒸留水で1/50の濃度に希釈し、炭素源として上澄水と同じTOC濃度となるように酢酸Naを加えた低栄養培地を用いて集積培養を行ったところ、ほとんどPCEが分解されないか、されても途中で分解が停止する結果が得られた。分解の見られた別の試料を用いて、低栄養培地により再度集積培養を行ったが同様な結果であった。

土壌洗浄上澄水では分解が見られ、低栄養培地では分解が見られないことから、低栄養培地にはPCE分解菌の増殖又はPCEの分解に必要な物質が足りないと考えられた。PCEの分解には補酵素が関与しているとの報告⁹⁾があり水嶋ら¹⁰⁾も土壌中の微量金属が微生物の育成あるいは活性発現の“場”が継代培養や分解活性の維持に必要な因子ではないかと推測していることから、ある種の微量金属がPCEの分解に必要なのではないかと考えられた。そこで、必要な微量金属類を絞り込むため、上澄水だけでなくPCE分解の見られる地下水の両方に共通して含有されている金属元素を探すことにした。用いた地下水は試料B1、B2の汚染現場から得たもので、地下水のみに2.2で作成した試料Aの供試試料と水素を加えても分解が起きないが、更に表2に示す培地及び酢酸Naを低栄養培地と同じ様に加えると分解されるため、地下水中の微量金属類と低栄養培地中の微量金属類が足りない分を相互に補っていると考えられた。上澄水と地下水に含まれる金属元素の同定と半定量分析はICP-MSにより行った。半定量分析では、正確な濃度は測定できないが、使用していた低栄養培地に含まれる金属元素の濃度とは大幅に濃度の異なるCaやZn等の金属元素が上澄水と地下水に幾つか共通して存在することが分かった。また、非金属元素のBも濃度が大幅に異なることが分かった。表7に比較して得られた結果を示す。

なお、濃度レベルは異なるが、必要と思われる金属元素は低栄養培地にも含まれているため、PCEの分解と菌の増殖には濃度レベルも考慮する必要があったと考えられた。また、培地に含まれ

る微量金属類の濃度レベルが異なることにより、存在する分解菌の多くが検索出来ずに見過ごされている可能性も考えられた。

表7 培地と洗浄上澄水、地下水中の金属元素、非金属元素濃度の比較

	洗浄上澄水	地下水	低栄養培地	改良低栄養培地
Na	2.6mg/l	6mg/l	26mg/l	32mg/l
Mg	1.9mg/l	7mg/l	0.59mg/l	5.9mg/l
K	1.0mg/l	0.71mg/l	2.9mg/l	2.8mg/l
Ca	4.5mg/l	19mg/l	0.14mg/l	18mg/l
Mn	76ug/l	1.3ug/l	0.91ug/l	0.91ug/l
Fe	4.4mg/l	0.071mg/l	0.008mg/l	0.08mg/l
Co	1.5ug/l	0.032ug/l	0.36ug/l	0.36ug/l
Cu	22ug/l	0.15ug/l	3.2ug/l	3.0ug/l
Zn	94ug/l	36ug/l	0.91ug/l	40ug/l
Mo	2.5ug/l	0.33ug/l	0.32ug/l	0.32ug/l
B	49ug/l	42ug/l	0.10ug/l	30ug/l

3. 4 改良低栄養培地によるPCE分解菌の集積培養

洗浄上澄水、地下水の金属及び非金属元素濃度に合わせた表3に示す改良低栄養培地を作成し、これを用いて集積培養を行ったところ、PCEの分解と菌の増殖が確認され、集積培養が可能であることが分かった。また、PCEの分解生成物として、TCEとcis-1,2-ジクロエチンが確認され、最終的にはcis-1,2-ジクロエチンのみが残留した。しかし、この培地においても長期間の培養を続けるとPCEの分解が停止した。培養後の改良低栄養培地のpHを調べたところ、全ての検体でpHが8.6～8.9とアルカリ側に傾いていることが分かった。また、分解が停止した検体は、新しい改良低栄養培地に植種してもPCEの分解及び菌の増殖を見せなかった。このことから集積培養菌中のPCE分解菌はpHが8.6付近で分解能力を失うことが分かった。低栄養細菌を検索するために培地の濃度は全てにおいて低く押さえられており、その結果pH緩衝能力も低下していることがpH上昇の原因と考えられた。

そこで改良低栄養培地中の KH_2PO_4 と $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ の濃度を2倍に増やし、pH緩衝能力を2倍(改良低栄養培地[pH×2])にして集積培養を行ったところ、図5に示すとおり分解が進んだ。

また、集積培養菌のPCE分解について水素無添加系と水素添加系で比較を行ったところ、図6に示すとおり水素無添加系においても分解が進み、むしろ分解は水素添加系よりも速い結果が得られた。約1ヶ月の培養後、水素添加系の培地のpHはアルカリ側に傾いていたが、水素無添加系

ではpH7付近を維持していた。この結果から、集積培養菌されているPCE分解菌は、水素を直接利用する場合とそれ以外の場合では分解メカニズムが異なるか、PCE分解菌が少なくとも2種存在することが考えられた。

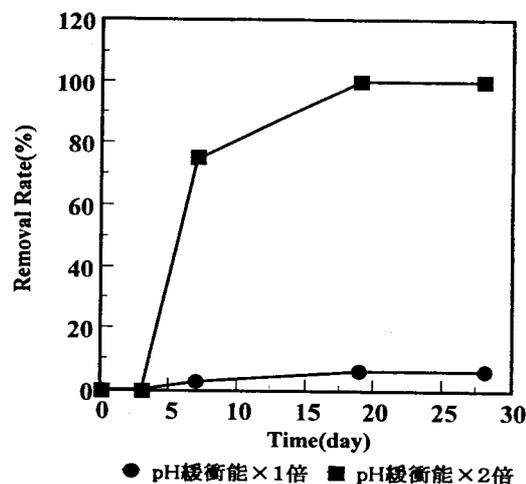


図5 pH緩衝能の違いによる集積培養菌のPCEの分解

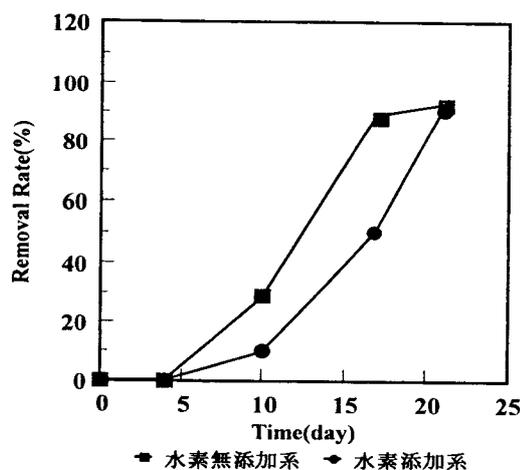


図6 PCE分解における集積培養菌に及ぼす水素の影響

更に、培養液1mlを新たに改良低栄養培地[pH×2]に植種して集積培養を続けたところ、水素添加系では分解が見られないにも関わらず、水素無添加系では分解が進んだ。PCEの最終的な分解生成物はcis-1,2-ジクロエチンであった。この結果から、PCE分解菌は2種類存在し、水素を直接電子供与体として利用する菌は、水素を利用できないもう1種より増殖速度が遅いのではないかと考えられた。

但し、洗浄上澄水中では、水素を添加しないと分解が進まない事から、実際の環境中では水素を直接電子供与体として利用できる菌の方が利用で

きない菌より優占種だと思われた。この理由は、服部ら⁹⁾の団粒モデルで述べられている微生物のサイズによる「すみか」—細菌を補食する原生動物や糸状菌が入ってこられない小さな孔隙を「すみか」とするか補食される大きな孔隙を「すみか」とするか—の違いによるもの、あるいは、水嶋らのいう“場”や服部らのいう土の固体表面が、水素を直接電子供与体として利用する菌にとって重要な因子なのではないかと推測された。

4. まとめ

低栄養条件で PCE を分解する微生物の検索と水素の添加により PCE の分解が促進されるか検討したところ以下の結果が得られた。

(1) 3種類の PCE 汚染土壌から PCE を分解する菌を検索したところ、1種類の土壌で水素を添加することにより PCE が分解された。また、分解の見られた土壌の洗浄上澄水は、温度範囲 15～30℃で PCE の分解が可能であった。

(2) PCE 分解菌の培養と分解能力の発現には、微量金属類の濃度レベルが重要であり、PCE 分解菌の検索に用いる培地は、現場土壌・地下水中に含有される微量金属類の濃度を参考にして作成する必要があると考えられた。

(3) PCE 分解菌を含む集積培養菌の分解生成物として、TCE、*cis*-1,2-ジクロロエチレンが確認され、最終的な分解生成物は *cis*-1,2-ジクロロエチレンであった。

(4) PCE 分解の見られた汚染土壌中には水素を直接電子供与体として利用出来る菌と利用出来ない菌の2種類の PCE 分解菌が存在することが分かった。また、水素を直接電子供与体として利用できる菌は、培養及び PCE 分解の結果として pH がアルカリ側に傾き、pH8.6 付近で分解及び増殖の停止が起きることが分かった。

今回検討した集積培養菌では、PCE を *cis*-1,2-ジクロロエチレンまでしか分解できなかったが、PCE をエチレンまで完全に分解できる低栄養細菌を検索し、利用することにより有機物の過剰添加による汚染を防ぎ、PCE による土壌・地下水を浄化する事が可能となると考えられた。

参考文献

- 1) Hinchee, R.E. and Leeson, A., Semprini, L. : Bioremediation of chlorinated solvents, Battele Press, Columbus
- 2) Freedman, D.L. and Gossett, J.M. : Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions, *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 2144-2151 (1989).
- 3) Gibson, S.A. and Sewell, G.W. : Stimulation of Reductive Dechlorination of Tetra-chloroethene in Anaerobic Aquifer Microcosms by Addition of Short-Chain Organic Acid or Alcohols, *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1392-1393 (1992).
- 4) DiStefano, T.D., Gossett, J.M. and Zinder, S.H. : Hydrogen as an electron donor for dechlorination of tetrachloroethene by an anaerobic mixed culture, *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3622-3629 (1992).
- 5) Xavier Maymo-Gatell, Yueh-tyng Chien, et al. : Isolation of a Bacterium That Reductively Dechlorinates Tetrachloroethene to Ethene., *SCIENCE*, VOL276, 6 JUNE, 1568-1571 (1997).
- 6) 土壌微生物研究会編：新・土の微生物(1)耕地・草地・林地の微生物, pp29
- 7) 神奈川県環境部水質保全課：平成9年度神奈川県公共用水域及び地下水の水質測定結果 (1998)
- 8) 西村 実：バイオレメディエーション—微生物による環境汚染浄化—、用水と排水., 38(3) (1996).
- 9) Gantzer, C.J., Wackett, L.P. : Reductive dechlorination catalyzed by bacterial transition-metal coenzymes, *Environ. Sci. Technol.*, 25 (4) 715-722 (1991).
- 10) 水嶋香織、伊藤清実、山本淳、近藤基一、内山裕夫：土壌より分離した PCE 分解混合微生物系の継代培養とその諸性質、*水環境学会誌*, 22(2) 139-144 (1999).